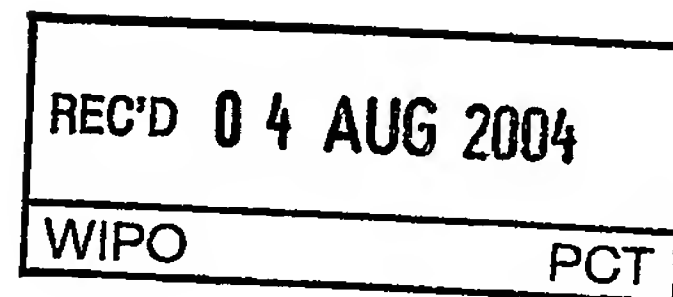


证 明

本证明之附件是向本局提交的下列专利申请副本

申 请 日: 2003.12.21
申 请 号: 2003101098297



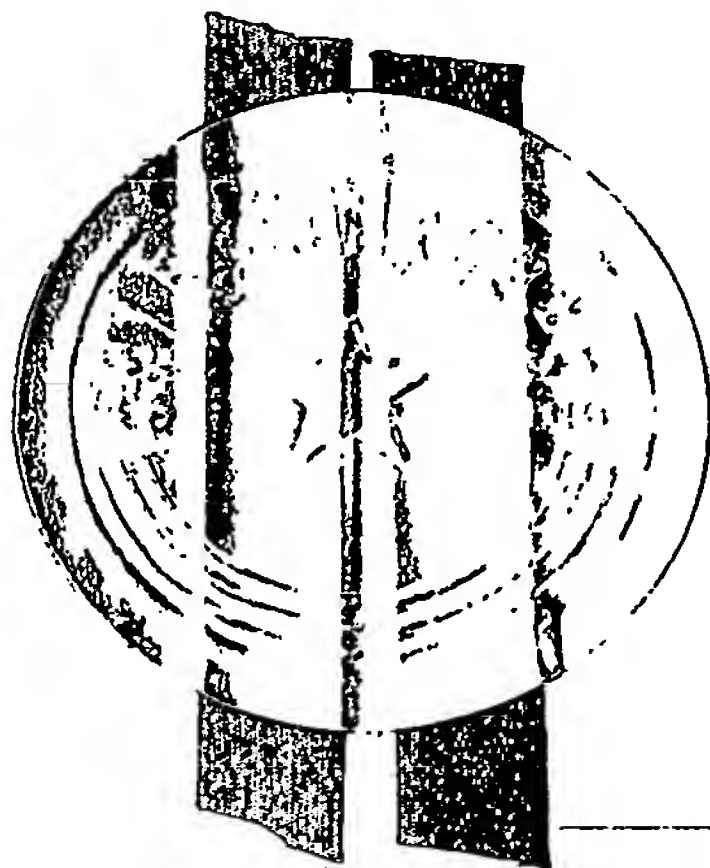
申 请 类 别: 发明

发明创造名称: 一种可用以抗癌治疗的超抗原融合蛋白质及其生产方法

申 请 人: 孙嘉琳

发明人或设计人: 孙嘉琳

BEST AVAILABLE COPY



中华人民共和国
国家知识产权局局长

王景川

2004 年 6 月 21 日

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

1、一种融合蛋白，其特征在于同时含有促进癌细胞生长的细胞因子和能起抗癌的免疫反应的超抗原。

2、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于所述的促进癌细胞生长的细胞因子为下述物质之一：细胞因子可以是表皮生长因子 EGF、血管内皮细胞生长因子 VEGF、碱性成纤维细胞生长因子 bFGF、转化生长因子 TGF- α 、白细胞介素-4 和白细胞介素-2 以及其它包括人和鼠等在内的各种物种来源的与癌或其它疾病有关联的细胞因子以及它们的自然变异体和人为的变异体，氨基酸序列有 70%以上的相同性。

3、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于所述的能起抗癌的免疫反应的超抗原为下述物质之一：金黄色葡萄球菌肠毒素家族的 SEA、SEB、SEC、SED、SEE，链球菌毒素的 SPE-A、SPE-B、SPE-C，以及其它包括病毒蛋白质在内的各种来源的超抗原以及它们的自然和人为的变异体，氨基酸序列有 70%以上的相同性。

4、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于所述的促进癌细胞生长的细胞因子为表皮生长因子 EGF 和血管内皮细胞生长因子 VEGF 之一。

5、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于所述的能起抗癌的免疫反应的超抗原为金黄色葡萄球菌肠毒素家族的 SEA。

6、根据权利要求 1 所述的融合蛋白，其特征在于由能起抗癌的免疫反应的超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素家族的 SEA 跟促进癌细胞生长的细胞因子表皮生长因子 EGF 和血管内皮细胞生长因子 VEGF 之一融合而成。

7、一种重组载体，其特征在于含有编码权利要求 1、权利要求 2、权利要求 3、权利要求 4、权利要求 5 或者权利要求 6 所述的融合蛋白的氨基酸序列。

- 8、一种转化体，其特征在于宿主细胞被权利要求 7 所述的重组载体转化。
- 9、一种生产融合蛋白的生产方法，其特征在于培养权利要求 8 所述的转化体，收集目标物质。
- 10、一种生产融合蛋白的纯化方法，其特征在于权利要求 8 所述的转化体经过培养后，利用 Tag 技术手段纯化融合蛋白。
- 11、融合蛋白在癌症以及免疫疾病等方面的治疗药物的应用。

一种可用以抗癌治疗的超抗原融合蛋白质及其生产方法

[技术领域]

本发明涉及一类可用以抗癌治疗的基因重组的新型超抗原融合蛋白质，描述了编码此类融合蛋白质的多核苷酸和氨基酸的序列，以及它们在大肠杆菌的表达和分离纯化。

[背景技术]

目前对于癌症疾病的药物治疗主要是以化学药物为主，副作用大，化学药物在杀伤癌细胞的同时也伤害了正常细胞，化学药物缺乏针对癌细胞的特异性作用。

为了解决药物的特异性问题，抗体是一类很有效的工具，是一种常用的癌细胞特异性定位导向载体，它可以特异地作用于癌细胞。抗体本身可以封闭癌细胞，它的 Fc 片段能引起细胞毒作用。抗体也可以接上一个毒素蛋白质，引导毒素蛋白质杀死癌细胞。

超抗原 (Superantigen) 也能引起细胞毒作用，它是一类特殊的抗原分子，主要是一些细菌的毒素和逆转录病毒基因的产物，不需要抗原提呈细胞的加工处理，而以完整的蛋白质形式直接与细胞膜上的 MHC II 类分子结合形成复合物，识别 TCR 的 Vb 片段，激活比普通抗原多得多的 T 细胞 (包括 CD4⁺, CD8⁺)，并释放大量的细胞因子，对靶细胞产生强而有力的细胞毒作用。

超抗原与人类多种急、慢性疾病的发生有关，但在抗肿瘤研究中也发挥了独特的作用，尝试用它激活的 T 细胞来杀伤肿瘤，并取得了一定的成果，目前



较有研究基础的超抗原主要是金黄色葡萄球菌肠毒素 A、B 等。因为超抗原无抗肿瘤的特异性，它也会作用于表达 MHC II 类分子的正常细胞上，直接用于抗肿瘤会产生副作用，临床使用有很多的限制。

为了解决超抗原的无抗肿瘤特异性问题，人们将超抗原连接到抗体上，由抗癌抗体将超抗原金黄色葡萄球菌肠毒素 A (Staphylococcal-enterotoxin A, SEA) 定位到癌细胞上 (M. Dohlsten, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 8945-8949, 1994; J. Ihle, et al, Cancer Res., 55, 623-628, 1995)。

要使抗体成为药物，就必须对于鼠源抗体进行人源化的基因工程改造。由于抗体药物的使用剂量很大，常常需要数十毫克/人/次，这就要求提高基因工程抗体的动物细胞的表达水平以及发展大规模发酵技术。所以抗体药物的研究开发的周期和投资成本是非常巨大的。

除了抗体外，与癌细胞生长有关的细胞因子也被用于癌细胞的定位。例如表皮生长因子 (Epidermal growth factor, EGF) 被连接到 RNA 水解酶 (H. Jinno, et al, Cancer Chemother. Pharmacol., 38, 303-308, 1996) 和毒素 (A. Schmidt, et al, Biochem. Biophys. Res. Commun., 277, 499-506, 2000)，碱性成纤维细胞生长因子 (Basic fibroblast growth factor, bFGF)、血管内皮细胞生长因子 (Vascular endothelial cell growth factor, VEGF) 和转化生长因子 (Transforming growth factor- α , TGF- α) 也分别与毒素形成融合蛋白质 (Biochem. Biophys. Res. Commun., 277, 499-506, 2000; L. M. Veenendaal, et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 99, 7866-7871, 2002; A. Kihara and I. Pastan, Cancer Res., 54, 5154-5159, 1994)。而其它的细胞因子也有报告，例如白细胞介素-4 (Interleukin-4) 和白细胞介素-2 (Interleukin-2) 则分别被连接到毒素上 (S. R. Husain, et al, Cancer Res., 58, 3649-3653, 1998; J. M. Dore, et al, FEBS Lett., 402, 50-52, 1997)。



以上的工作都使用细胞因子与蛋白质毒素或RNA水解酶所组成的融合蛋白质的形式，思想方法是出于同样的战略模式（E. B. Sweeney and J. R. Murphy, Essays Biochem., 30, 119-131, 1995）。在这些细胞因子的癌细胞定位的作用下，蛋白质毒素和RNA水解酶才特异地杀伤癌细胞或者治疗其它疾病。但是这个作用机制是不同于抗体的Fc片段以及超抗原，后两者是动员机体的免疫系统来激发抗癌的细胞毒作用。

癌细胞是由正常细胞转变而来的，癌细胞的抗原是自身抗原，所以癌细胞能够逃避免疫系统的监视。人们一直在寻找新的抗癌方法来提高癌症病人的免疫力，特别是针对癌细胞的特异性免疫力。

[发明内容]

为了有效地开发针对癌症的特异性药物，本发明利用超抗原和细胞因子的各自特性，构建一种新型细胞因子-超抗原融合蛋白质，促进癌细胞生长的细胞因子可以将融合蛋白质定位到癌细胞上，而超抗原则在癌细胞周围引起抗癌的免疫反应，即超抗原依赖的细胞介导的细胞毒作用（Superantigen-dependent-cellular-cytotoxicity, SDCC）。利用此方法就可以将这种类型的融合蛋白质特异地定位到癌细胞并在癌细胞周围引起抗癌的细胞毒免疫反应。

超抗原的种类可以是金黄色葡萄球菌肠毒素（Staphylococcal-enterotoxin, SE）家族的SEA, SEB, SEC, SED, SEE；链球菌毒素（Streptococcal pyrogenic exotoxin, SPE）的SPE-A, SPE-B, SPE-C；以及其它包括病毒蛋白质在内的各种来源的超抗原以及它们的自然和人为的变异体。这些蛋白质同样可以说明本



发明的思想。

细胞因子可以是表皮生长因子 EGF, 血管内皮细胞生长因子 VEGF, 碱性成纤维细胞生长因子 bFGF, 转化生长因子 TGF- α , 白细胞介素 IL-4 以及白细胞介素 IL-2; 以及其它包括人和鼠等在内的各种物种来源的与癌或其它疾病有关联的细胞因子以及它们的自然变异体和人为的变异体。这些蛋白质同样可以说明本发明的思想。

本发明选择了一个崭新的战略, 将超抗原连接到细胞因子上, 这样产生了新型的细胞因子-超抗原融合蛋白质, 作为一个模型, 本发明使用表皮生长因子 EGF 和血管内皮细胞生长因子 VEGF 分别与超抗原 SEA 来构建这种新型的融合蛋白质。

在此虽然只选择超抗原 SEA, 当然超抗原 SEB 和 SEC 以及其它超抗原也能够说明本发明的思想。抗原 SEA 或其它超抗原的作用是激发机体内的免疫反应。

同样, 作为实验材料的表皮生长因子 EGF 和血管内皮细胞生长因子 VEGF 只是利用它们癌细胞的定位作用, 采用与癌细胞紧密相关的其它细胞因子也能够说明本发明的思想。

考虑到本发明的融合蛋白质可以由各种类型的细胞因子与超抗原构建, 所以采用了一个通用的蛋白质纯化方法, 即按照同样的方法来纯化各种融合蛋白质。此方法是利用一个 Cellulose binding domain (CBD) 作为纯化用的 Tag, 质粒 pET-34b (Novagen 公司) 含有这个 CBD-Tag。

采用与癌紧密有关的细胞因子作为癌细胞定向的载体, 是因为癌细胞通常大量表达这些细胞因子的受体。以 EGF 为例, 癌细胞膜上通常异常地大量表达 EGF 受体, EGF 通过与 EGF 受体相互作用来促进癌细胞的生长。同样癌组织也



通过异常高表达 VEGF 受体来接受 VEGF 的信号, 促进癌组织血管异常生长, 从而使得整个癌组织不断扩大。

而正常细胞膜上的这些受体的表达量没有或很少, 所以细胞因子也可以起着癌细胞的特异性定位作用。利用 EGF 和 VEGF 能认识癌细胞的特性, 把超抗原 SEA 分别连接到 EGF 和 VEGF 上, 就能使得 SEA 集中在癌细胞的周围, 特异地激发免疫反应, 产生极其强大的针对癌细胞的细胞毒作用。单独使用超抗原 SEA 会产生全身用药的副作用, 而采用融合蛋白质就会使得只在癌组织周围集中由 SEA 所诱导的大量 T 杀伤细胞。

超抗原 SEA 与 T 细胞激活产生增殖和产生细胞毒作用呈剂量依赖关系, 其范围在每只小鼠 $0.1\mu\text{g}\sim 100\mu\text{g}$, 最大效应出现在注射后 24 小时, 96 小时内消失, SDCC 最大效应浓度为每只小鼠 $1\mu\text{g}$, 效应高峰在第 48 小时, 96 小时内消失 (G. Hedlund, et al, Cancer Immunol. Immunother., 36, 89-93, 1993)。

所以融合蛋白质可以发挥类似于抗体-SEA 的作用, 而采用这个方法能够节约药物开发成本, 例如小鼠抗体人源化和大规模动物细胞表达生产。所以超抗原 SEA 的药物就能大大地降低药物生产和病人医疗成本, 同样含有超抗原 SEA 的本发明的融合蛋白质也可以大大地降低使用剂量。

SEA 基因早在 80 年代就报道了 (I. Y. Huang, et al, J. Biol. Chem., 262, 7006-7013, 1987; M. J. Betley and J. J. Mekalanos, J. Bacteriol., 170, 34-41, 1988)。

EGF 基因也在 80 年代早期被发现了 (J. Smith, et al, Nucleic Acids Res., 10, 4467-4482, 1982; A. Gray, et al, Nature, 303, 722-725, 1983), 它的成熟形式是 53 氨基酸的多肽。

VEGF 基因是在 80 年代后期被发现 (D. W. Leung, et al, Science, 246,

1306-1309, 1989; P. J. Keck, et al, Science, 246, 1309-1312, 1989), 由于 mRNA 的不同剪切, 它的成熟形式有多种形式, 长度可以是 189、165 以及 121 氨基酸的多肽 (E. Tischer, et al, J. Biol. Chem., 266, 11947-11954, 1991)。

EGF-SEA 和 VEGF-SEA 仅仅是用来说明本发明的材料, 而本发明的思想范围可以拓展, 例如可以采用各种类型的细胞因子和超抗原以及它们的变异体, 对融合蛋白质的结构进行改造, 这些变异体可以完善其生物学功能以及减少其可能产生的副作用。

融合蛋白质可以是 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 形式, 也可以是 SEA-EGF 和 SEA-VEGF 形式, 在空间上两种蛋白质是独立的, 所以两种形式都可以使得细胞因子和超抗原独立地发挥作用。

连接这两种蛋白质的 Linker 的氨基酸组分和长度则可以是各种形式, 过短的 Linker 会造成细胞因子和超抗原因过分接近而产生空间阻碍, 合适的 Linker 对于充分发挥细胞因子和超抗原的作用是至关重要的。

以上的各种融合蛋白质基因可以转入动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母、细菌等生物体在内的重组工程化宿主细胞, 表达方式可以是分泌和不分泌等各种形式。无细胞体外翻译系统也可以用来进行融合蛋白质的生产。

融合蛋白质也可以通过化学交联反应等化学反应手段分别将细胞因子和超抗原的多肽片段进行连接, 例如共价键连接, 从而构建成融合蛋白质。

对于融合蛋白质可以进行化学修饰、缺损融合蛋白质的一部分多肽片段以及将其它多肽连接在这些蛋白质上等一系列的改造。

纯化后的融合蛋白质可以通过一系列蛋白质的变性和复性过程来完善其包括二硫键在内的空间结构, 从而提高它的生物活性。



本发明阐述的是一种新的抗癌方法，即把细胞因子和超抗原构建成融合蛋白质，由细胞因子将超抗原定位到癌细胞上，从而在癌细胞周围发生抗癌的细胞毒免疫反应。

融合蛋白质不但可以起着和抗体相似的特异性抗癌作用，而且由超抗原所激发的 T 细胞杀伤效果要大于抗体，使用剂量却远远低于抗体药物的用量，这样就可以大大地降低生产成本。

作为药物形式应用的融合蛋白质可应用于抗癌和免疫疾病等医学的临床方面，它们和防腐剂、乳化剂、脂质体、分散剂、安定化剂等一起制成各种注射、口服、敷贴以及手术处理等药物的给药形式。

除了融合蛋白质本身可以作为药物外，编码融合蛋白质的核苷酸片段或载体还可以作为基因治疗形式来应用。例如将这些核苷酸片段注射动物体内并被转入细胞，从而表达融合蛋白质。

[附图说明]

图 1 是表示用 PCR 方法构建 EGF-SEA 融合蛋白质基因的构建图。

图 2 是表示用 PCR 方法构建 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的构建图。

图 3 表示了 EGF-SEA 融合蛋白质纯化后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。

图 4 表示了 VEGF-SEA 融合蛋白质纯化后的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的结果。

图 1 中的实验过程是首先经过第一次 PCR 反应分别取得 EGF 和 SEA 基因的 DNA 多核苷酸片段，然后利用 Overlap extension PCR 方法将这两个片段连接



在一起, 这样就将形成的 EGF-SEA 融合蛋白质的基因片段插入一个大肠杆菌表达用的载体并进行融合蛋白质的生产。

图 2 中的实验过程是首先经过第一次 PCR 反应分别取得 VEGF 和 SEA 基因的 DNA 多核苷酸片段, 然后利用 Overlap extension PCR 方法将这两个片段连接在一起, 这样就将形成的 VEGF-SEA 融合蛋白质的基因片段插入一个大肠杆菌表达用的载体并进行融合蛋白质的生产。

[具体实施方式]

本发明采用的是 EGF-Linker-SEA 和 VEGF-Linker-SEA 的形式, Linker 是一个短的多肽, 它将 EGF 和 VEGF 分别与 SEA 连接在一起。

根据已知的 SEA、EGF 和 VEGF 基因序列, 设计一系列的引物, 通过多聚酶链反应 (Polymerase chain reaction, PCR) 分离这些基因, 再用 PCR 方法将 EGF 和 VEGF 分别与 Linker 和 SEA 形成一个融合蛋白质的 DNA 片段。然后将这个基因片段插入一个大肠杆菌表达质粒, 在 T7 启动子的控制下, 融合蛋白质大量表达, 最后将表达的融合蛋白质进行分离纯化。

本发明实验中所使用的编码蛋白质和多肽的形式:

- (1) 成熟形式的 SEA;
- (2) 53 氨基酸的 EGF;
- (3) 121 氨基酸的 VEGF;
- (4) 用于连接细胞因子和超抗原的 Linker, 它的多核苷酸组成是 GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG, 编码了 15 氨基酸的 GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer 多肽。

使用的大肠杆菌质粒是 pET-34b (Novagen 公司), 长度约为 6kb, 它含有起始密码子 ATG 以及终止信号 TAA, 在这两者之间有多个限制酶位点以及用于分



离纯化的 CBD-Tag, 在此采用的是 SrfI 和 NotI 限制酶位点, 另外作为选择用的抗生素是卡那霉素, T7 启动子控制基因表达。

实施例 1、分离超抗原 SEA 基因

按照常规的分子生物学实验方法 (T. Maniatis, et al, Molecular cloning, A laboratory manual, Second edition, Cold spring harbor laboratory, 1989), 用酚/氯仿抽提法从金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus FRI337) 的 DNA, 根据文献上的超抗原 SEA 基因的序列 (M. J. Betley and J. J. Mekalanos, J. Bacteriol., 170, 34-41, 1988) 设计引物: (1) 含有 SrfI 限制酶切点的正向引物, 5'-GAGCCCGGGCAGCGAGAAAAGCGAAGAAATAAAT-3'; (2) 含有 NotI 限制酶切点的反向引物, 5'-GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3'。用此引物将 SEA 基因进行 PCR 扩增反应。模板的量为 0.1 微升, PCR 反应的循环条件: 95℃30 秒→55℃30 秒→72℃120 秒, 一共是 30 个循环反应, 最后是 72℃10 分钟。DNA 片段的长度大约是 700bp。

将这个 DNA 产物进行低熔点胶的电泳, 回收 DNA 片段, 再对这个片段进行 SrfI 和 NotI 限制酶处理后, 得到的基因片段插入 pET-34b 质粒, DNA 连接酶的反应是 16℃12 小时。最后进行 DNA 测序。

实施例 2、分离表皮生长因子 EGF 基因

根据已报告的表皮生长因子 EGF 基因序列设计引物 (J. Smith, et al, Nucleic Acids Res., 10, 4467-4482, 1982): (1) 含有 SrfI 限制酶切点的正向引物, 5'-GAGCCCGGGCAATTCCGATAGCGAGTGT-3'; (2) 含有 NotI 限制酶切点的反向引物, 5'-GTGCGGCCGCTCTAAGTTCCCACCATTT-3'。利用 PCR 方法从



Human breast carcinoma cDNA 基因文库 (Clontech 公司) 中分离 EGF 基因, 它编码一个 53 氨基酸的多肽。模板的量为 0.1 微升, PCR 反应的循环条件: 95℃ 30 秒→55℃30 秒→72℃30 秒, 一共是 30 个循环反应, 最后是 72℃10 分钟。DNA 片段的长度大约是 170bp。

将这个 DNA 产物进行低融点胶的电泳, 回收 DNA 片段, 再对这个片段进行 SrfI 和 NotI 限制酶处理后, 然后将基因片段插入 pET-34b 质粒, DNA 连接酶的反应是 16℃12 小时。最后进行 DNA 测序。

实施例 3、分离血管内皮细胞生长因子 VEGF

从报告的血管内皮细胞生长因子 VEGF 基因序列 (P. J. Keck, et al, Science, 246, 1309-1312, 1989; E. Tischer, et al, J. Biol. Chem., 266, 11947-11954, 1991) 中设计 VEGF-121 的引物: (1) 含有 SrfI 限制酶切点的正向引物, 5'-GAGCCCGGGC GCACCCATGGCAGAAGGAGGA-3'; (2) 含有 NotI 限制酶切点的反向引物, 5'-GTGCGGCCCGCCCGCCTCGGCTTGTCACATTTTCTTGCTTGCTCTATCT TTCTT-3'。利用 PCR 方法从 Human breast carcinoma cDNA 基因文库 (Clontech 公司) 中分离 VEGF-121 基因, 它编码一个 121 氨基酸的多肽。模板的量为 0.1 微升, PCR 反应的循环条件: 95℃30 秒→55℃30 秒→72℃50 秒, 一共是 30 个循环反应, 最后是 72℃10 分钟。DNA 片段的长度大约是 370bp。

将这个 DNA 产物进行低融点胶的电泳, 回收 DNA 片段, 再对这个片段进行 SrfI 和 NotI 限制酶处理后, 然后将基因片段插入 pET-34b 质粒, DNA 连接酶的反应是 16℃12 小时。最后进行 DNA 测序。

实施例 4、用含有 Linker 的引物构建 EGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因

通过 Overlap extension PCR 方法 (R. M. Horton, et al, Methods Enzymol., 217,



270-279, 1993) , 采用编码一个 15 氨基酸多肽 (GlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySerGlyGlyGlyGlySer) 的多核苷酸片段来连接 EGF 和 SEA。

第一组引物:

- 1、含有 SrfI 限制酶切点的 EGF 基因正向引物, 5'-GAGCCCGGGCAATTCCGATAGCGAGTGTCCT-3';
- 2、含有一部分 Linker 的 EGF 基因反向引物, 5'-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC-TCTAAGTTCCCA CCATTTCAG-3', 下划线表注的是 Linker 的一部分序列。

第二组引物:

- 1、一部分 Linker 的成熟 SEA 基因正向引物, 5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG-AGCGAGAAAAG CGAAGAAATAAATGAA-3', 下划线表注的是 Linker 的一部分序列;
- 2、含有 NotI 限制酶切点的 SEA 基因反向引物, 5'-GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3'。

首先用第一组和第二组的引物分别合成 EGF 基因和 SEA 基因的 DNA 片段, 模板是实施 2 和实施 1 的经过 DNA 测序的基因, 这是第一步 PCR 反应。然后进行电泳, 切割含有 DNA 片段的凝胶, 这样就去除了 PCR 反应的引物。

取出以上微量的两种基因片段的 DNA 回收液并将这两者混合, 加入 DNA 多聚酶, 将两个 DNA 片段连在一起, 这个片段就是新一轮 PCR 反应的模板, 再加入第一组引物 (1) 和第二组引物 (2), 反应条件是 95°C30 秒→55°C30 秒→72°C150 秒, 一共是 3 个循环反应。



再加入引物：(1) 含有 SrfI 限制酶切点的 EGF 基因正向引物，5'-GAGCCCGGGCAATTCCGATAGCGAGTGTCT-3'；(2) 含有 NotI 限制酶切点的 SEA 基因反向引物，5'-GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3'。最后进行 PCR 反应，PCR 反应的循环条件：95℃30 秒→55℃30 秒→72℃150 秒，一共是 30 个循环反应，最后是 72℃10 分钟。

这样就构建成了 EGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因片段。

实施例 5、用含有 Linker 的引物构建 VEGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因与实施例 4 类似，采用 Overlap extension PCR 方法。

第一组引物：

1、含有 SrfI 限制酶切点的正向引物，5'-GAGCCCGGGC GCACCCATGGCAGAAGGAGGA-3'；

2、含有一部分 Linker 的 VEGF 基因反向引物，5'-GCCAGAGCCACCTCCGCCTGAACCGCCTCCACC-CCGCCTCGGCTT GTCACATTTTTC-3'，下线表注的是 Linker 的一部分序列。

第二组引物：

1、一部分 Linker 的成熟 SEA 基因正向引物，5'-TCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCG-AGCGAGAAAAG CGAAGAAATAAATGAA-3'，下线表注的是 Linker 的一部分序列；

2、含有 NotI 限制酶切点的 SEA 基因反向引物，5'-GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3'。

首先用第一组和第二组的引物分别合成 VEGF 基因和 SEA 基因的 DNA 片



段，模板是实施 3 和实施 1 的经过 DNA 测序的基因，这是第一步 PCR 反应。然后进行电泳，切割含有 DNA 片段的凝胶，这样就去除了 PCR 反应的引物。

取出以上微量的两种基因片段的 DNA 回收液并将这两者混合，加入 DNA 多聚酶，将两个 DNA 片段连在一起，这个片段就是新一轮 PCR 反应的模板，再加入第一组引物（1）和第二组引物（2），反应条件是 95°C 30 秒 \rightarrow 55°C 30 秒 \rightarrow 72°C 150 秒，一共是 3 个循环反应。

再加入引物：（1）含有 SrfI 限制酶切点的 VEGF 基因正向引物，5'-GAGCCCGGGC GCACCCATGGCAGAAGGAGGA-3'；（2）含有 NotI 限制酶切点的 SEA 基因反向引物，5'-GTGCGGCCGCACTTGTATATAAATATATATCAATATGCAT-3'。最后进行 PCR 反应，PCR 反应的循环条件： 95°C 30 秒 \rightarrow 55°C 30 秒 \rightarrow 72°C 150 秒，一共是 30 个循环反应，最后是 72°C 10 分钟。

这样就构建成了 VEGF 和 SEA 的融合蛋白质的基因片段。

实施例 6、在大肠杆菌中分别表达 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 的融合蛋白质的基因

（A）构建表达质粒并进行 DNA 序列测定

将实施例 4 和实施例 5 的融合蛋白质基因的 DNA 片段用 SrfI 和 NotI 限制酶处理，同时 pET-34b 质粒也用 SrfI 和 NotI 限制酶处理，再用 DNA 连接酶分别把这两个 DNA 片段连接到 pET-34b 质粒上，DNA 连接酶的反应是 16°C 12 小时。这样就得到了含有两种融合蛋白质基因的质粒。

用氯化钙制备成感受态大肠杆菌 BL21，通过 Heat shock 方法把这两种质粒分别转入大肠杆菌 BL21，在含有卡那霉素的 LB 培养基中过夜培养，卡那霉素



的浓度为 5mg/L。然后筛选有卡那霉素抗性的单菌落。用常规方法 (T. Maniatis, et al, Molecular cloning, A laboratory manual, Second edition, Cold spring harbor laboratory, 1989) 制备和纯化质粒, 并鉴定大肠杆菌中的质粒的限制酶图谱, 以确定融合蛋白质基因转入大肠杆菌。

这样就分别得到了含有 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的两种大肠杆菌的菌株, 菌株用含有 15%甘油的培养基保存于-70℃。

最后将两种质粒中的 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的 DNA 序列进行测定。

序列表中的序列 1 是表皮生长因子 (EGF) -Linker-超抗原- (SEA) 融合蛋白质基因的序列: 从第 1 位氨基酸到第 53 位氨基酸的多肽是 EGF, 从第 54 位氨基酸到第 68 位氨基酸的多肽是 Linker, 从第 69 位氨基酸到第 301 位氨基酸的多肽是 SEA。序列 2 是序列 1 的氨基酸序列。

序列表中的序列 3 是血管内皮细胞生长因子 (VEGF) -Linker-超抗原- (SEA) 融合蛋白质基因的序列: 从第 1 位氨基酸到第 121 位氨基酸的多肽是 VEGF, 从第 122 位氨基酸到第 136 位氨基酸的多肽是 Linker, 从第 137 位氨基酸到第 369 位氨基酸的多肽是 SEA。序列 4 是序列 3 的氨基酸序列。

(B) 融合蛋白质基因的表达

在 37℃下分别含有两种质粒的大肠杆菌在含有卡那霉素的培养基中培养, 由于这两种融合蛋白质基因是在 T7 启动子的控制下, 再在培养液中加入 1mM IPTG, 进行过夜培养, 它们就可以大量表达。

附图 1 和附图 2 分别表示了构建和表达 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质基因的实验过程。



实施例 7、分离和纯化 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质

将实施例 6 中的两种大量表达 EGF-SEA 和 VEGF-SEA 融合蛋白质的大肠杆菌培养液进行离心 (5000rpm, 30min), 收集菌体并用 50mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗涤, 然后用超声波方法破碎大肠杆菌。再进行离心 (10000rpm, 30min), 收集上清液, 这样就得到了含有融合蛋白质的粗抽提液。

pET-34b 质粒含有一个 CBD 序列片段, 它可以作为分离纯化用的 Tag, 利用这个 CBD 的特性, 可以使用纤维素树脂来直接分离纯化被表达的外源蛋白质, 这个方法具有通用性, 用于分离纯化的材料是 CBIND ReadyRun Column (Novagen 公司)。将粗抽提液上样于纤维素树脂的层析柱, 当含有 CBD 的融合蛋白质被吸附到纤维素层析柱后, 先用 20mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 洗去杂蛋白质, 然后用含有 1% 纤维二糖的磷酸缓冲液洗脱融合蛋白质, 收集含有融合蛋白质的洗脱液。

在洗脱液里加入 Enterokinase 以切除 CBD 部分, 然后进行透析, 透析在 4℃ 低温以及 20mM 磷酸缓冲液 (pH7.0) 中进行, 这样就去除了纤维二糖。将透析后的溶液再进行纤维素处理, 游离的 CBD 部分被吸附到纤维素上, 而不含 CBD 的融合蛋白质则不会被吸附, 从而就得到了没有 CBD 部分的高纯度融合蛋白质。附图 3 和附图 4 是两种融合蛋白质的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳结果, 附图 3 表示了精制后的 EGF-SEA, 而附图 4 则表示了精制后的 VEGF-SEA。

测定了这两种蛋白质的 N 末端的氨基酸序列, 它们分别与 EGF 和 VEGF 的 N 末端氨基酸相同。



核苷酸和/或氨基酸序列表

<110> 孙嘉琳

<120> 一种可用以抗癌治疗的超抗原融合蛋白质及其生产方法

<160> 4

<210> 1

<211> 903

<212> DNA

<213> Human and Staphylococcus aureus

<400> 1

aat tcc gat agc gag tgt cct ctg agt cac gat ggt tac tgt cta	45
Asn Ser Asp Ser Glu Cys Pro Leu Ser His Asp Gly Tyr Cys Leu	
1 5 10 15	
cat gac ggc gtc tgt atg tat att gag gct cta gac aag tac gcg	90
His Asp Gly Val Cys Met Tyr Ile Glu Ala Leu Asp Lys Tyr Ala	
20 25 30	
tgt aat tgc gtt gtt ggc tac atc ggt gag cgc tgt cag tat cga	135
Cys Asn Cys Val Val Gly Tyr Ile Gly Glu Arg Cys Gln Tyr Arg	
35 40 45	
gat ctg aaa tgg tgg gaa ctt aga ggt gga ggc ggt tca ggc gga	180
Asp Leu Lys Trp Trp Glu Leu Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly	
50 55 60	
ggt ggc tct ggc ggt ggc gga tcg agc gag aaa agc gaa gaa ata	225
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Glu Lys Ser Glu Glu Ile	
65 70 75	
aat gaa aaa gat ttg cga aaa aag tct gaa ttg cag gga aca gct	270
Asn Glu Lys Asp Leu Arg Lys Lys Ser Glu Leu Gln Gly Thr Ala	
80 85 90	
tta ggc aat ctt aaa caa atc tat tat tac aat gaa aaa gct aaa	315
Leu Gly Asn Leu Lys Gln Ile Tyr Tyr Tyr Asn Glu Lys Ala Lys	
95 100 105	

act	gaa	aat	aaa	gag	agt	cac	gat	caa	ttt	tta	cag	cat	act	ata	360
Thr	Glu	Asn	Lys	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	His	Thr	Ile	
				110					115					120	
ttg	ttt	aaa	ggc	ttt	ttt	aca	gat	cat	tcg	tgg	tat	aac	gat	tta	405
Leu	Phe	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp	His	Ser	Trp	Tyr	Asn	Asp	Leu	
				125					130					135	
tta	gta	gat	ttt	gat	tca	aag	gat	att	gtt	gat	aaa	tat	aaa	ggg	450
Leu	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Lys	Tyr	Lys	Gly	
				140					145					150	
aaa	aaa	gta	gac	ttg	tat	ggg	gct	tat	tat	ggg	tat	caa	tgt	gcg	495
Lys	Lys	Val	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Cys	Ala	
				155					160					165	
ggg	ggg	aca	cca	aac	aaa	aca	gct	tgt	atg	tat	ggg	ggg	gta	acg	540
Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Lys	Thr	Ala	Cys	Met	Tyr	Gly	Gly	Val	Thr	
				170					175					180	
tta	cat	gat	aat	aat	cga	ttg	acc	gaa	gag	aaa	aaa	gtg	ccg	atc	585
Leu	His	Asp	Asn	Asn	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Pro	Ile	
				185					190					195	
aat	tta	tgg	cta	gac	ggg	aaa	caa	aat	aca	gta	cct	ttg	gaa	acg	630
Asn	Leu	Trp	Leu	Asp	Gly	Lys	Gln	Asn	Thr	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	
				200					205					210	
ggt	aaa	acg	aat	aag	aaa	aat	gta	act	ggt	cag	gag	ttg	gat	ctt	675
Val	Lys	Thr	Asn	Lys	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	
				215					220					225	
caa	gca	aga	cgt	tat	tta	cag	gaa	aaa	tat	aat	tta	tat	aac	tct	720
Gln	Ala	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ser	
				230					235					240	
gat	ggt	ttt	gat	ggg	aag	ggt	cag	agg	gga	tta	atc	gtg	ttt	cat	765
Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Lys	Val	Gln	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Phe	His	
				245					250					255	
act	tct	aca	gaa	cct	tcg	ggt	aat	tac	gat	tta	ttt	ggg	gct	caa	810
Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Val	Asn	Tyr	Asp	Leu	Phe	Gly	Ala	Gln	
				260					265					270	
gga	cag	tat	tca	aat	aca	cta	tta	aga	ata	tat	aga	gat	aat	aaa	855
Gly	Gln	Tyr	Ser	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Asn	Lys	
				275					280					285	
acg	att	aac	tct	gaa	aac	atg	cat	att	gat	ata	tat	tta	tat	aca	900
Thr	Ile	Asn	Ser	Glu	Asn	Met	His	Ile	Asp	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr	
				290					295					300	

agt
Ser

⟨210⟩ 2

⟨211⟩ 301

⟨212⟩ PRT

⟨400⟩ 2

Asn	Ser	Asp	Ser	Glu	Cys	Pro	Leu	Ser	His	Asp	Gly	Tyr	Cys	Leu
1				5					10					15
His	Asp	Gly	Val	Cys	Met	Tyr	Ile	Glu	Ala	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ala
				20					25					30
Cys	Asn	Cys	Val	Val	Gly	Tyr	Ile	Gly	Glu	Arg	Cys	Gln	Tyr	Arg
				35					40					45
Asp	Leu	Lys	Trp	Trp	Glu	Leu	Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
				50					55					60
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Ile
				65					70					75
Asn	Glu	Lys	Asp	Leu	Arg	Lys	Lys	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala
				80					85					90
Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ala	Lys
				95					100					105
Thr	Glu	Asn	Lys	Glu	Ser	His	Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	His	Thr	Ile
				110					115					120
Leu	Phe	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr	Asp	His	Ser	Trp	Tyr	Asn	Asp	Leu
				125					130					135
Leu	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Lys	Asp	Ile	Val	Asp	Lys	Tyr	Lys	Gly
				140					145					150
Lys	Lys	Val	Asp	Leu	Tyr	Gly	Ala	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Cys	Ala
				155					160					165
Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Lys	Thr	Ala	Cys	Met	Tyr	Gly	Gly	Val	Thr
				170					175					180
Leu	His	Asp	Asn	Asn	Arg	Leu	Thr	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Pro	Ile
				185					190					195
Asn	Leu	Trp	Leu	Asp	Gly	Lys	Gln	Asn	Thr	Val	Pro	Leu	Glu	Thr
				200					205					210
Val	Lys	Thr	Asn	Lys	Lys	Asn	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Leu	Asp	Leu
				215					220					225
Gln	Ala	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gln	Glu	Lys	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ser

				230					235					240
Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Lys	Val	Gln	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Phe	His
				245					250					255
Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Val	Asn	Tyr	Asp	Leu	Phe	Gly	Ala	Gln
				260					265					270
Gly	Gln	Tyr	Ser	Asn	Thr	Leu	Leu	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Asn	Lys
				275					280					285
Thr	Ile	Asn	Ser	Glu	Asn	Met	His	Ile	Asp	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr
				290					295					300
Ser														

<210> 3

<211> 1107

<212> DNA

<213> Human and Staphylococcus aureus

<400> 3

gca	ccc	atg	gca	gaa	gga	gga	ggg	cag	aat	cat	cac	gaa	gtg	gtg	45
Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	
1				5				10				15			
aag	ttc	atg	gat	gtc	tat	cag	cgc	agc	tac	tgc	cat	cca	atc	gag	90
Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	
				20				25				30			
acc	ctg	gtg	gac	atc	ttc	cag	gag	tac	cct	gat	gag	atc	gag	tac	135
Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	
				35				40				45			
atc	ttc	aag	cca	tcc	tgt	gtg	ccc	ctg	atg	cga	tgc	ggg	ggc	tgc	180
Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	
				50				55				60			
tgc	aat	gac	gag	ggc	ctg	gag	tgt	gtg	ccc	act	gag	gag	tcc	aac	225
Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	
				65				70				75			
atc	acc	atg	cag	att	atg	cgg	atc	aaa	cct	cac	caa	ggc	cag	cac	270
Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His	
				80				85				90			
ata	gga	gag	atg	agc	ttc	cta	cag	cac	aac	aaa	tgt	gaa	tgc	aga	315

Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg	
				95					100					105	
cca	aag	aaa	gat	aga	gca	aga	caa	gaa	aaa	tgt	gac	aag	ccg	agg	360
Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Lys	Cys	Asp	Lys	Pro	Arg	
				110					115					120	
cgg	ggt	gga	ggc	ggt	tca	ggc	gga	ggt	ggc	tct	ggc	ggt	ggc	gga	405
Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	
				125					130					135	
tcg	agc	gag	aaa	agc	gaa	gaa	ata	aat	gaa	aaa	gat	ttg	cga	aaa	450
Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Lys	Asp	Leu	Arg	Lys	
				140					145					150	
aag	tct	gaa	ttg	cag	gga	aca	gct	tta	ggc	aat	ctt	aaa	caa	atc	495
Lys	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile	
				155					160					165	
tat	tat	tac	aat	gaa	aaa	gct	aaa	act	gaa	aat	aaa	gag	agt	cac	540
Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Asn	Lys	Glu	Ser	His	
				170					175					180	
gat	caa	ttt	tta	cag	cat	act	ata	ttg	ttt	aaa	ggc	ttt	ttt	aca	585
Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	His	Thr	Ile	Leu	Phe	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr	
				185					190					195	
gat	cat	tcg	tgg	tat	aac	gat	tta	tta	gta	gat	ttt	gat	tca	aag	630
Asp	His	Ser	Trp	Tyr	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Lys	
				200					205					210	
gat	att	ggt	gat	aaa	tat	aaa	ggg	aaa	aaa	gta	gac	ttg	tat	ggt	675
Asp	Ile	Val	Asp	Lys	Tyr	Lys	Gly	Lys	Lys	Val	Asp	Leu	Tyr	Gly	
				215					220					225	
gct	tat	tat	ggt	tat	caa	tgt	gcg	ggt	ggt	aca	cca	aac	aaa	aca	720
Ala	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Lys	Thr	
				230					235					240	
gct	tgt	atg	tat	ggt	ggt	gta	acg	tta	cat	gat	aat	aat	cga	ttg	765
Ala	Cys	Met	Tyr	Gly	Gly	Val	Thr	Leu	His	Asp	Asn	Asn	Arg	Leu	
				245					250					255	
acc	gaa	gag	aaa	aaa	gtg	ccg	atc	aat	tta	tgg	cta	gac	ggt	aaa	810
Thr	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Pro	Ile	Asn	Leu	Trp	Leu	Asp	Gly	Lys	
				260					265					270	
caa	aat	aca	gta	cct	ttg	gaa	acg	ggt	aaa	acg	aat	aag	aaa	aat	855
Gln	Asn	Thr	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Val	Lys	Thr	Asn	Lys	Lys	Asn	
				275					280					285	
gta	act	ggt	cag	gag	ttg	gat	ctt	caa	gca	aga	cgt	tat	tta	cag	900
Val	Thr	Val	Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gln	
				290					295					300	
gaa	aaa	tat	aat	tta	tat	aac	tct	gat	ggt	ttt	gat	ggg	aag	ggt	945
Glu	Lys	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Lys	Val	
				305					310					315	

cag	agg	gga	tta	atc	gtg	ttt	cat	act	tct	aca	gaa	cct	tcg	gtt	990
Gln	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Phe	His	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Val	
				320					325					330	
aat	tac	gat	tta	ttt	ggt	gct	caa	gga	cag	tat	tca	aat	aca	cta	1035
Asn	Tyr	Asp	Leu	Phe	Gly	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr	Ser	Asn	Thr	Leu	
				335					340					345	
tta	aga	ata	tat	aga	gat	aat	aaa	acg	att	aac	tct	gaa	aac	atg	1080
Leu	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Asn	Lys	Thr	Ile	Asn	Ser	Glu	Asn	Met	
				350					355					360	
cat	att	gat	ata	tat	tta	tat	aca	agt							
His	Ile	Asp	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Ser							

<210> 4

<211> 369

<212> PRT

<400> 4

Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val
1				5				10						15
Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu
				20				25						30
Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr
				35				40						45
Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys
				50				55						60
Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	Thr	Glu	Glu	Ser	Asn
				65				70						75
Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	Gln	Gly	Gln	His
				80				85						90
Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	Glu	Cys	Arg
				95				100						105
Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Lys	Cys	Asp	Lys	Pro	Arg
				110				115						120
Arg	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly
				125				130						135
Ser	Ser	Glu	Lys	Ser	Glu	Glu	Ile	Asn	Glu	Lys	Asp	Leu	Arg	Lys
				140				145						150

Lys	Ser	Glu	Leu	Gln	Gly	Thr	Ala	Leu	Gly	Asn	Leu	Lys	Gln	Ile
				155					160					165
Tyr	Tyr	Tyr	Asn	Glu	Lys	Ala	Lys	Thr	Glu	Asn	Lys	Glu	Ser	His
				170					175					180
Asp	Gln	Phe	Leu	Gln	His	Thr	Ile	Leu	Phe	Lys	Gly	Phe	Phe	Thr
				185					190					195
Asp	His	Ser	Trp	Tyr	Asn	Asp	Leu	Leu	Val	Asp	Phe	Asp	Ser	Lys
				200					205					210
Asp	Ile	Val	Asp	Lys	Tyr	Lys	Gly	Lys	Lys	Val	Asp	Leu	Tyr	Gly
				215					220					225
Ala	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Gln	Cys	Ala	Gly	Gly	Thr	Pro	Asn	Lys	Thr
				230					235					240
Ala	Cys	Met	Tyr	Gly	Gly	Val	Thr	Leu	His	Asp	Asn	Asn	Arg	Leu
				245					250					255
Thr	Glu	Glu	Lys	Lys	Val	Pro	Ile	Asn	Leu	Trp	Leu	Asp	Gly	Lys
				260					265					270
Gln	Asn	Thr	Val	Pro	Leu	Glu	Thr	Val	Lys	Thr	Asn	Lys	Lys	Asn
				275					280					285
Val	Thr	Val	Gln	Glu	Leu	Asp	Leu	Gln	Ala	Arg	Arg	Tyr	Leu	Gln
				290					295					300
Glu	Lys	Tyr	Asn	Leu	Tyr	Asn	Ser	Asp	Val	Phe	Asp	Gly	Lys	Val
				305					310					315
Gln	Arg	Gly	Leu	Ile	Val	Phe	His	Thr	Ser	Thr	Glu	Pro	Ser	Val
				320					325					330
Asn	Tyr	Asp	Leu	Phe	Gly	Ala	Gln	Gly	Gln	Tyr	Ser	Asn	Thr	Leu
				335					340					345
Leu	Arg	Ile	Tyr	Arg	Asp	Asn	Lys	Thr	Ile	Asn	Ser	Glu	Asn	Met
				350					355					360
His	Ile	Asp	Ile	Tyr	Leu	Tyr	Thr	Ser						

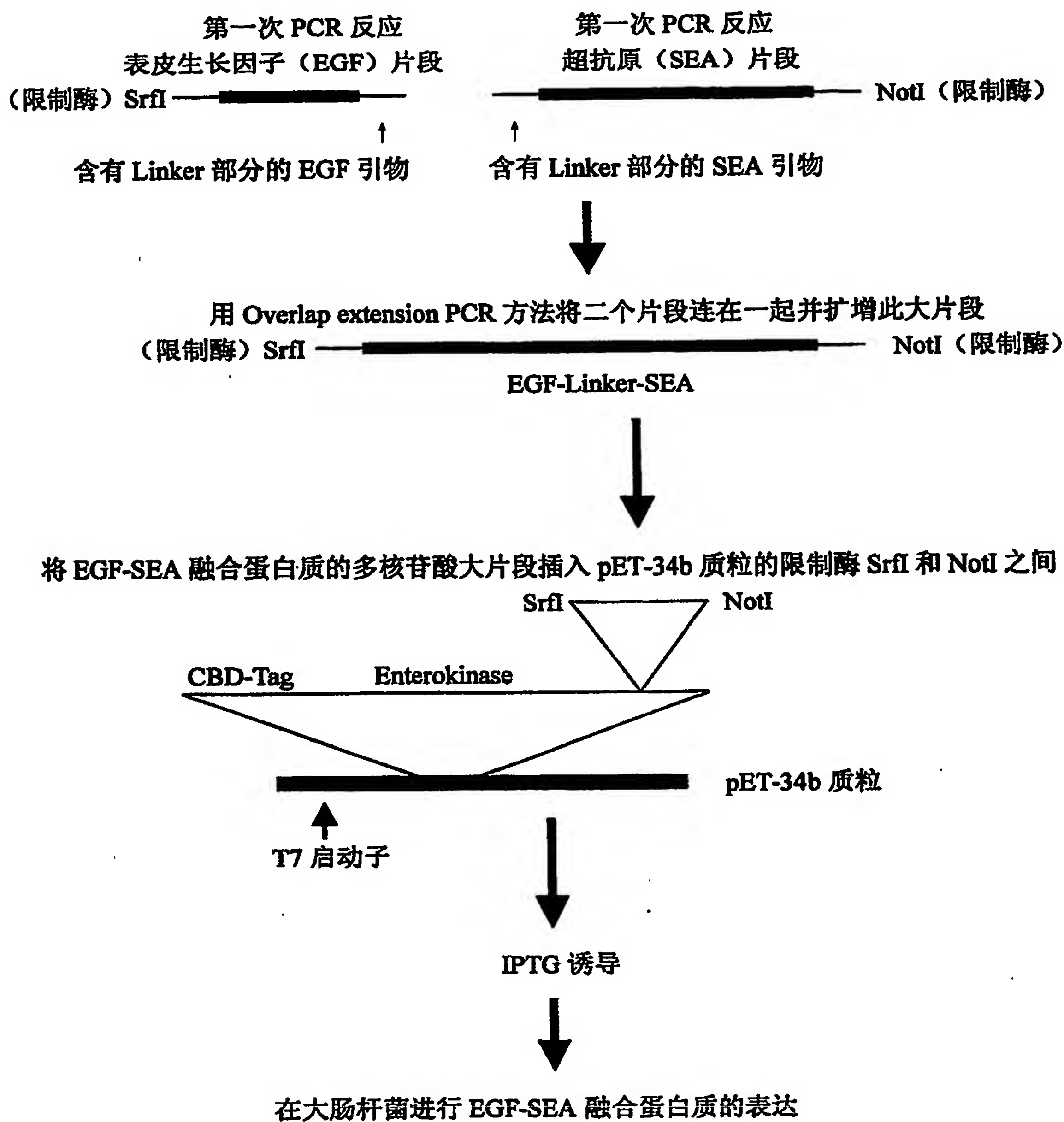


图 1

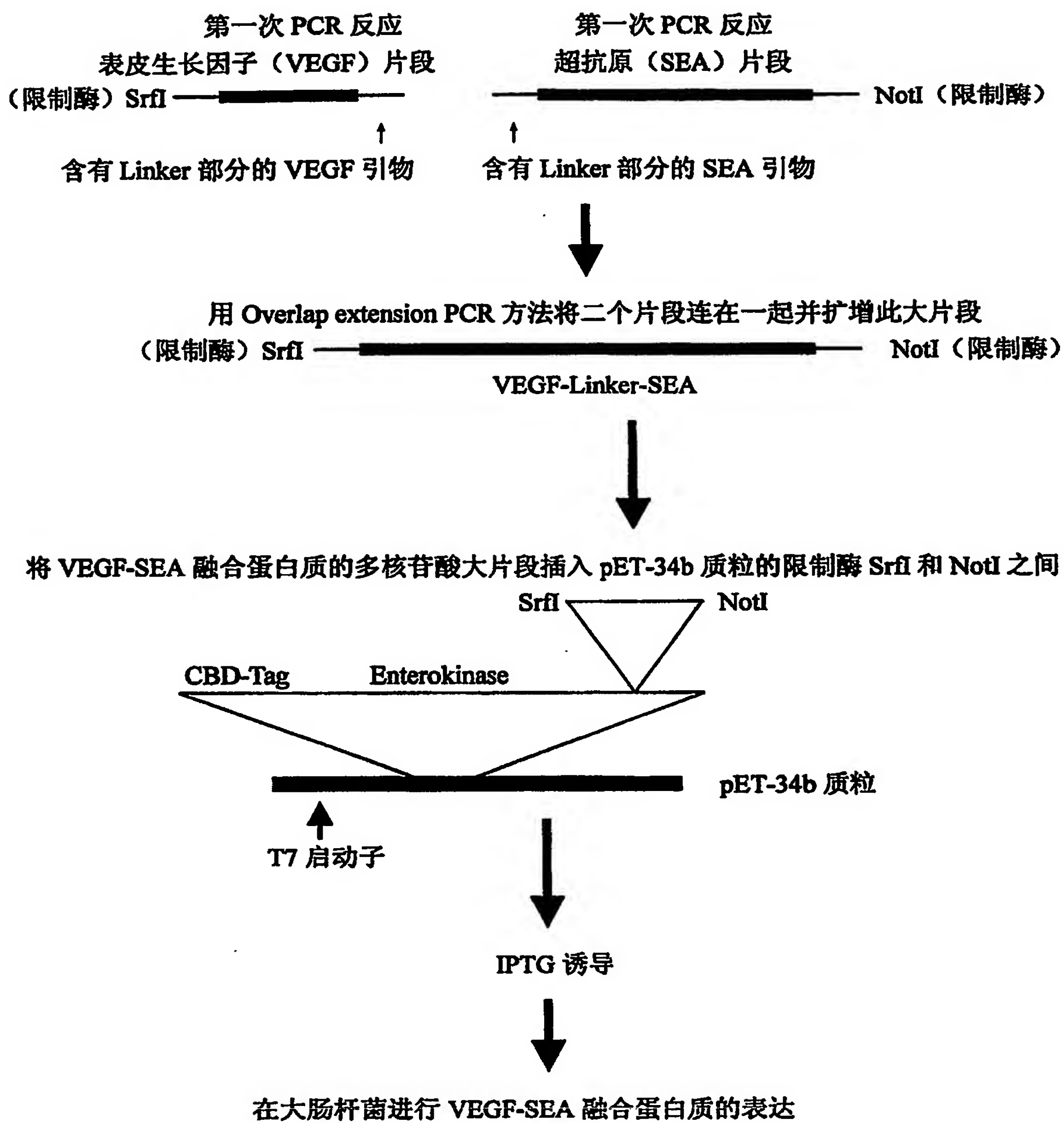
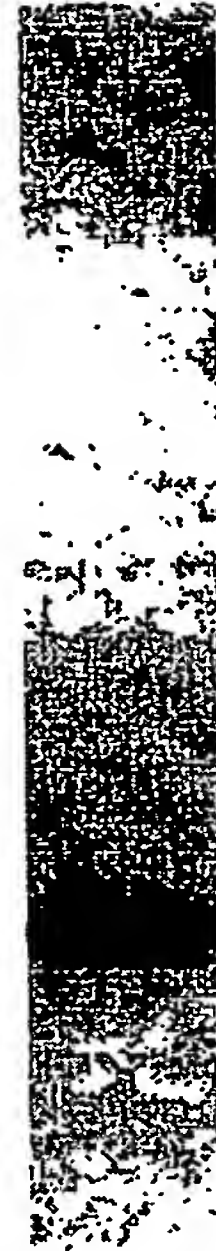


图 2





EGF-SEA

图 3





VEGF-SEA

图 4



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.